



**UADY**  
CIENCIAS DE LA SALUD  
FACULTAD DE  
ODONTOLOGÍA

EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA *in vitro* DE IRRIGANTE  
A BASE DE HOJAS DE *Azadirachta Indica* Linn CONTRA  
*Enterococcus faecalis*

Tesis presentada por:

MIRTA DARELY UC CEN

En opción al Diploma de Especialización en:

ENDODONCIA

Directoras:

M. EN O. MARÍA EUGENIA LÓPEZ VILLANUEVA  
DRA. EUGENIA DEL SOCORRO GUZMÁN MARÍN

Mérida, Yucatán, Julio 2018





**UADY**  
CIENCIAS DE LA SALUD  
FACULTAD DE  
ODONTOLOGÍA

EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA *in vitro* DE IRRIGANTE  
A BASE DE HOJAS DE *Azadirachta Indica* Linn CONTRA  
*Enterococcus faecalis*

Tesis presentada por:

MIRTA DARELY UC CEN

En opción al Diploma de Especialización en:

ENDODONCIA

Directoras:

M. EN O. MARÍA EUGENIA LÓPEZ VILLANUEVA  
DRA. EUGENIA DEL SOCORRO GUZMÁN MARÍN

Mérida, Yucatán, Julio 2018



**UADY**  
CIENCIAS DE LA SALUD  
FACULTAD DE  
ODONTOLOGÍA

UNIDAD DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

Mérida, Yucatán, 1 de Julio de 2018

**C. MIRTA DARELY UC CEN**

Con base en el dictamen emitido por sus Directoras y revisores, le informo que la Tesis titulada **"EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA *in vitro* DE IRRIGANTE A BASE DE HOJAS DE *Azadirachta indica* Linn CONTRA *Enterococcus faecalis*"**, presentada como cumplimiento a uno de los requisitos establecidos para optar al Diploma de la Especialización en Endodoncia, ha sido aprobada en su contenido científico, por lo tanto, se le otorga la autorización para que una vez concluidos los trámites administrativos necesarios, se le asigne la fecha y hora en la que deberá realizar su presentación y defensa.

**M. C. O. José Rubén Herrera Atoche**  
Jefe de la Unidad de Posgrado e Investigación

M. en O. María Eugenia López Villanueva  
Directora de Tesis

Dra. Eugenia del Socorro Guzmán Marín  
Directora de Tesis

M. en O. Gabriel Alvarado Cárdenas  
Revisor

Dr. Florencio Rueda Gordillo  
Revisor

Artículo 78 del reglamento interno de la  
Facultad de Odontología de la  
Universidad Autónoma de Yucatán.

Aunque una tesis hubiera servido para  
el examen profesional y hubiera sido  
aprobada por el sínodo, solo su autor o  
autores es responsable de las  
doctrinas emitidas en ella.

Este trabajo se realizó en el Centro de Investigaciones Regionales Dr. Hideyo Noguchi de la Universidad Autónoma de Yucatán, bajo la dirección de las Doctoras: María Eugenia López Villanueva y Eugenia del Socorro Guzmán Marín. Los resultados presentados, son parte del proyecto de investigación “Terapia endodóntica en dientes permanentes en diferentes estadios de formación radicular” con registro en el SISTPROY con clave FODO-2017-0002.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios, mi todopoderoso y misericordioso, creo fielmente que las circunstancias presentes en mi vida son porqué así las has escrito, gracias mantenerme firme ante situaciones difíciles, gracias por el amor infinito que manifiestas en mí a través de las personas que has puesto en mi camino. Gracias por la vida.

A mis mentores de la especialidad, por su paciencia y dedicación ilimitada, por sus conocimientos transmitidos, por las llamadas de atención y exigencias con el fin de hacernos mejores personas y profesionales.

A la Dra. Eugenia Guzmán Marín por el gran apoyo, amparo y conocimiento transmitido hacia mi persona para la realización de este trabajo de tesis

Al Químico Miguel Angel Puc por su paciencia, entrega y pasión para la realización de este proyecto de tesis, por permitirme trabajar a su lado e involucrarse y comprometerse al 100% en todo momento.

Al Centro de Investigaciones Regionales de la UADY “Dr. Hideyo Noguchi” por permitirme trabajar en sus instalaciones durante la elaboración de este trabajo.

Agradezco a los doctores José Manuel Pech Ramírez y Juan Ricardo Oliva Luna por sus conocimientos y los ánimos transmitidos para la continuación de mi preparación profesional.

Agradezco de igual manera a CONACYT, por el gran apoyo que se me otorgó a través de la beca que se asigna a la Institución y además brindarnos los medios para lograr elaborar nuestras investigaciones científicas.

## DEDICATORIA

A mis padres, dedico esta tesis a ustedes porque nada de esto hubiera podido lograrse sin su ayuda, por su amor y confianza incondicional a pesar de mis errores, por caminar a mi lado a pesar de los obstáculos que pudieron presentarse, por sus palabras de aliento y por darme ánimos, por nunca soltarme y dejarme caer. El resultado de todo esto es por y para ustedes.

A mis hermanos, por ser mis mejores amigos, mis mejores críticos, mis cómplices en todo momento.

A ti, Luis A, porque sin duda alguna parte de todo esto es tuyo, por tus días y noches de desvelo a mi lado, por tu convicción al brindarme cariño, comprensión y amor, por ser fuente de motivación, por llegar a mi vida.

A ti Shir, a ti María, no solo mis mejores amigas sino mis hermanas del Alma.

A mis amigos presentes y pasados, en especial a Sebastián, Ricardo, Jesús, Marítza, Edel, Claudia y Verónica por hacer de estos dos años una experiencia inolvidable, por los buenos ratos y los no tan buenos, por convertirse en un gran apoyo y llegar a ser más que mis amigos.

## ÍNDICE

RESUMEN	
DEFINICIÓN DEL PROBLEMA	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
HIPÓTESIS	12
JUSTIFICACIÓN	13
OBJETIVOS	14
MATERIAL Y MÉTODOS	15
RESULTADOS	24
DISCUSIÓN	27
CONCLUSIONES	29
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Medios de cultivo para pruebas bioquímicas de identificación antes de ser inoculados y sometidos a condiciones de crecimiento bacteriano.	17
Figura 2. Extracto acuoso de <i>Azadirachta indica</i> Linn al 10% y 20.	18
Figura 3. Materiales y soluciones utilizadas para la preparación del hipoclorito de sodio a diferentes concentraciones.	20
Figura 4. Resiembra de microorganismo a caldo Müeller Hinton.	20
Figura 5. Ajuste del inóculo bacteriano.	21
Figura 6. Inóculo bacteriano ajustado al patrón McFarland.	21
Figura 7. Depósito de medio de cultivo Müeller Hinton, suspensión bacteriana y sustancias antimicrobianas a microplaca.	22
Figura 8. Microplaca adicionada con Müeller Hinton, suspensión bacteriana y sustancias antimicrobianas	23
Figura 9. Cambio de coloración y patrón de turbidez observado en medios de cultivo tras ser inoculado y sometido a condiciones de crecimiento.	24
Figura 10. Placa de microtitulación posterior a su incubación. Se observa formación de botón bacteriano tras la aplicación de prueba de susceptibilidad bacteriana.	25

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Características de un agente antiplaca ideal.	6
Tabla 2. Pruebas bioquímicas de identificación utilizadas para la caracterización fenotípica de <i>E. faecalis</i> .	16
Tabla 3. Pruebas bioquímicas de identificación utilizadas para la caracterización fenotípica de <i>E. faecalis</i> . (Manual of clinical microbiology).	17
Tabla 4. Soluciones y sus concentraciones para preparación de hipoclorito de sodio a diferentes porcentajes.	19
Tabla 5. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos acuosos de <i>A. indica</i> al 10% y 20% frente a inóculo bacteriano de <i>E. faecalis</i> a diferentes diluciones.	26

## RESUMEN

**OBJETIVO.** Evaluar *in vitro* la actividad antimicrobiana del extracto acuoso de *Azadirachta indica* contra *E. faecalis*

**INTRODUCCIÓN.** El problema relacionado con el control y el tratamiento de enfermedades infecciosas bucales sigue sin resolverse, la utilización de antisépticos y desinfectantes para el control de diferentes agentes infecciosos y contaminantes todavía presenta inconvenientes; sobre todo hacia los tejidos circundantes. Se ha descrito además la resistencia adquirida por las bacterias ante los fármacos.

Por lo tanto, en años recientes se ha dirigido la atención hacia las plantas quienes producen diversos metabolitos secundarios, algunos de ellos con actividad antimicrobiana, considerándose una fuente importante para el hallazgo de nuevos agentes terapéuticos

**MATERIAL Y MÉTODO.** El estudio es de carácter experimental.

Universo: microorganismos pertenecientes al género y especie *E. faecalis*

- 1.- Obtención de la cepa bacteriana: reactivación, siembra y cultivo
- 2.- Recolección de muestra vegetal: preparación de extracto acuoso
- 3.- Pruebas de susceptibilidad: método de microdilución en placa
- 4.- Análisis de resultados

**RESULTADOS.** La actividad antimicrobiana del extracto acuoso de *A. indica* no mostró actividad contra *E. faecalis* a concentraciones del 10% y 20%. De igual manera el espécimen bacteriano mostró resistencia frente al hipoclorito de sodio a una concentración de 0.5%.

**CONCLUSIÓN.** La resistencia bacteriana a los antibióticos representa un problema grave para los médicos y la industria farmacéutica, en el caso de endodoncia, los microorganismos resistentes a los agentes antimicrobianos y procedimientos de rutina representan una problemática en cuanto al porcentaje de éxito del tratamiento

Por lo tanto, se sugieren realizar más estudios con la presente especie vegetal a diferentes concentraciones y con otro tipo de solventes para una mejor obtención de sus compuestos metabólicos

## DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

La endodoncia se ocupa del estudio de la morfología, la función, la salud, las lesiones y las alteraciones de la pulpa dental y la región periodontal, A través del tratamiento endodóntico que se va a mantener o restablecer la salud de dichos tejidos, de la pulpa dental o parte de la misma, cuando ésta ha sufrido alguna lesión o alteración.

Sin embargo, pese a los avances en el tratamiento de enfermedades endodónticas, la ocurrencia de resultados desfavorables después del tratamiento sigue siendo un problema importante en la práctica clínica.

Hoy día, se postula que la verdadera causa de fracaso de muchos tratamientos de conductos aparentemente correctos es la entidad infecciosa conocida como biofilm, difícil de erradicar y a menudo resistentes a los agentes antimicrobianos y procedimientos de rutina

Las necesidades de retratamiento pueden deberse a la reinfección por las bacterias orales o, más a menudo, a la persistencia y el nuevo crecimiento de microorganismos que no se eliminan durante el tratamiento anterior.

Entre las especies bacterianas que con más frecuencia se encuentran relacionadas con fracasos en la terapia de conductos, se encuentra el *Enterococcus faecalis*.

Los métodos actuales de limpieza de conductos radiculares dan forma a una capa de barrillo que contiene sustancias orgánicas e inorgánicas, microorganismos y material necrótico. El uso de irrigantes en endodoncia está destinado a limpiar correctamente el sistema de conductos radiculares, posiblemente a través de la eliminación de la propia capa de barrillo. Uno de los irrigantes más utilizados, sin embargo, ampliamente debatido en endodoncia es el hipoclorito de sodio. A pesar de sus ventajas (amplio espectro antimicrobiano, capacidad oxidante, fuerte y rápido, fácil de usar, económico, etc.), adolece de varios inconvenientes como olor y sabor desagradable, sobre todo, agresividad frente a los tejidos blandos.

En los últimos años se han incrementado los estudios de sustancias naturales con aplicación en odontología para la remoción de placa, tales como *Camellia sinensis*, *Calendula officinalis*, *Psidium guajava*, *Matricaria recutita*, *Tabebuia serratifolia*, *Theobroma cacao L*, *Plantago major L*, *Erythroxylum novogranatense*, *Plowmanvar truxillense* entre otras.

*Azadirachta indica* posee propiedades, tales como efecto antiinflamatorio, antiviral, antibacteriano, antifúngico, antioxidante e inmunomodulador entre otros, por lo que la convierte en una planta utilizada en medicina tradicional, en relación a lo anterior se plantea la siguiente pregunta: ¿Elaborar una sustancia irrigadora con base en esta especie tendrá actividad antimicrobiana contra *E. faecalis* principal microorganismo aislado en tratamientos endodónticos fallidos?

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### ECOLOGÍA DE LA CAVIDAD ORAL

La microbiota de la cavidad bucal es compleja; está compuesta por microorganismos que ahí se desarrollan y sobreviven, solo aquellos que pueden adherirse y permanecer en la cavidad bucal tienen oportunidad de crecer, multiplicarse y establecerse como miembros de la microbiota bucal; gran parte de los microorganismos que ingresan se eliminan y sólo un pequeño porcentaje puede adherirse y persistir (1).

Los microorganismos han sido reconocidos durante mucho tiempo como la etiología primaria en el desarrollo de lesiones óseas periapicales y el fracaso del tratamiento endodóntico, la reinfección y la inflamación periapical continua pueden ocurrir a partir de bacterias residentes del sistema del conducto radicular y los túbulos dentinarios (2).

El éxito del tratamiento endodóntico depende de la eliminación de la microflora infecciosa del conducto radicular, sin embargo, los estudios demuestran que la desinfección completa es difícil de lograr debido a las complejidades anatómicas del sistema de conductos radiculares. En la cavidad oral, comúnmente existen microorganismos en comunidades complejas de biofilm, que son difíciles de erradicar y a menudo son resistentes a los agentes antimicrobianos (2). Las bacterias en el biofilm pueden ser 10-1,000 veces más resistentes a los efectos de los agentes antimicrobianos que las bacterias planctónicas (3).

Los enterococos son cocos grampositivos y, debido a sus características morfológicas y genéticas, pueden resistir procedimientos intraconductos y antibióticos sistémicos, incluso en condiciones ecológicas de estrés (4).

#### *1.1 Enterococcus faecalis*

A pesar de que *Enterococcus faecalis* se aísla típicamente de los conductos radiculares de dientes con enfermedad periapical persistente, en la que su prevalencia varía entre 24% y 77% (3). La presencia de otras bacterias puede mejorar

significativamente la virulencia de *E. faecalis*, lo que enfatiza la importancia de la naturaleza multiespecie de las biopelículas endodónticas (2).

Su resistencia a los irrigantes y medicamentos antibacterianos reside principalmente en su modo de crecimiento como una biopelícula en las paredes de los conductos radiculares (3).

Los mecanismos de resistencia de *E. faecalis* son el resultado de cambios fisiológicos o estructurales en la célula bacteriana, que es una estrategia de supervivencia al ataque abusivo por agentes antimicrobianos (5).

## SUSTANCIAS ANTIMICROBIANAS.

### 2.1 Agentes químicos antisépticos y desinfectantes.

El biofilm de la placa dental está íntimamente ligado a las patologías bucodentales, desde este punto una gran variedad de agentes antimicrobianos se utiliza experimentalmente para el control de los microorganismos bucales relacionados con la formación de la biopelícula de placa dental; sin embargo, el control químico de la placa organizada resulta poco efectivo ante la resistencia que opone esta verdadera biopelícula a la acción de los antimicrobianos. Los procedimientos y las sustancias destinados a reducir o eliminar agentes infecciosos y contaminantes se utilizan desde hace mucho tiempo, por ejemplo, por medio de agentes químicos antimicrobianos (6).

En odontología se observa con mayor interés el uso de agentes que actúan directamente contra mecanismos de adherencia específica o interfiriendo sobre el metabolismo bacteriano:

#### 2.1.2 Clorhexidina

La clorhexidina en forma de colutorio es el agente quimioterapéutico más recomendado en el tratamiento de la gingivitis y el control de la placa dentobacteriana. Los colutorios antisépticos que llevan clorhexidina incorporada son de los más utilizados actualmente. En la mayoría de los colutorios antisépticos se encuentra a concentraciones de 0,12% o de 0,20%. La inhibición de la placa

bacteriana por la clorhexidina es dosis dependiente, por lo que se puede conseguir igual inhibición de placa con un volumen menor de un colutorio a mayor concentración. La dosis óptima de clorhexidina liberada en un colutorio con un buen equilibrio entre la eficacia y los efectos secundarios es de alrededor de unos 20 mg. Parece que recomendar tiempos cortos de enjuague mejora el cumplimiento y produce menor tinción (30 segundos) (7).

### 2.1.3 Gluconato de clorhexidina

El gluconato de clorhexidina es una sal de clorhexidina y ácido glucónico. La clorhexidina es una bisguanida de naturaleza catiónica, por lo que tiene afinidad por la pared celular de los microorganismos, que está cargada negativamente, alterándola. Tiene actividad antibacteriana de amplio espectro siendo activa frente a microorganismos (Gram+ y Gram-), hongos, dermatofitos y algunos virus.

Es bactericida a concentraciones altas y bacteriostáticas a bajas concentraciones. No produce cambios en las resistencias bacterianas ni sobrecrecimiento de microorganismos oportunistas. Previene la formación de placa, rompiendo la placa existente y debido a su estructura catiónica, su actividad se ve reducida en presencia de agentes aniónicos como son los detergentes de los dentífricos, por lo que se debe esperar 30 minutos para realizar el enjuague tras el cepillado dental, lo cual dificulta su correcto uso (1)

El gluconato de clorhexidina es extremadamente eficaz contra los microorganismos asociados con la etiología de la caries dental y se presenta en distintas formas para su aplicación clínica: barnices al 10%, geles al 1%, colutorios al 0.12% y pastas dentales al 0.02% (1).

### 2.1.4 Ácidos y álcalis

El efecto antimicrobiano se relaciona con su grado de disociación: a mayor disociación mayor efecto bactericida. Los ácidos orgánicos deben su acción a toda su molécula y los álcalis en general, a su grado de disociación.

El ácido sórbico, el ácido benzoico y otros ácidos se emplean como conservadores de bebidas, cosméticos, etc., éstos ácidos controlan el crecimiento de hongos y otros microorganismos. El ácido bórico en solución acuosa al 4% se emplea como antiséptico en colutorios. El ácido tricloroacético al 50% es un poderoso cáustico. El hidróxido de calcio es un álcali muy utilizado en endodoncia (8).

#### 2.1.5 Yodo y yodoformo

Las concentraciones estudiadas son del 2% al 10%. A estas concentraciones tiene un amplio rango de actividad. Actúa por liberación lenta del yodo causando oxidación tóxica y reacciones de sustitución en el interior del microorganismo. La yodopovidona es activa contra bacterias Gram positivas, Gram negativas, hongos, virus y micobacterias. Se emplea como desinfectante en cavidad bucal al 8% (solución bucofaríngea) (1).

#### 2.1.6 Cloro y compuestos de cloros

El hipoclorito de sodio actúa inhibiendo las reacciones enzimáticas y desnaturalizando las proteínas, es un bactericida de elevada potencia y amplio espectro antimicrobiano. La mayor resistencia de los microorganismos se puede compensar acidificando la solución desinfectante, incrementando la temperatura o la concentración de hipoclorito sódico (9).

Tabla 1. Características de un agente antiplaca ideal (1)(9).

- 
- |    |  |
|----|--|
| a) | Debe eliminar rápidamente la placa organizada                                |
| b) | Debe inhibir la formación de nueva placa                                     |
| c) | No debe ser tóxico   |
| d) | No debe poseer efectos secundarios adversos                                  |
| e) | Debe tener características organolépticas aceptables                         |
| f) | Debe poseer sustentividad  |
| g) | No debe ser inactivado por productos de los microorganismos o del hospedador |
| h) | No debe generar resistencia bacteriana                                       |
| i) | Debe alterar en forma mínima la microbiota asociada con la salud             |
| j) | No debe ser carcinogénico.   |
-

El uso de sustancias antimicrobianas para la prevención de la caries dental y enfermedades periodontales, puede resultar beneficioso siempre que se las considere como adyuvantes de un control mecánico de la biopelícula por medios físicos (cepillado; uso de hilo de seda dental), los que facilitan su desestructuración. El nivel de actividad de los agentes químicos puede ser bajo, intermedio o alto, según el tipo de microorganismo que destruya (10).

#### 2.1.7 Nuevas estrategias preventivas

Cuando se conocieron los agentes infecciosos, comenzó la denodada lucha por combatirlos tanto fuera como dentro del organismo. Sin embargo; la cavidad bucal no puede ser esterilizada; una eliminación exagerada de la microbiota puede provocar cambios en su ecología dando lugar a la colonización y proliferación de microorganismos oportunistas (1).

Además de los fenómenos de resistencia y de las disbacteriosis debidas a la supresión de la microbiota natural del organismo, los antimicrobianos son responsables de reacciones de alergia, actualmente no existe ningún agente químico antimicrobiano que sea el “mejor” para todos y cada uno de los casos, dada la diversidad de circunstancias en que pueden utilizarse estos agentes y la composición de las células microbianas sobre las que actúan (1).

Desde el punto de vista de la odontología preventiva, a nivel individual y comunitario, la higiene bucal es un factor clave para el mantenimiento de una adecuada salud bucodental. De esta manera, el control de la placa dentobacteriana (biofilm o biopelícula), constituyen una medida de salud pública bucal costo-efectiva y uno de los principales hábitos de higiene bucal destinados a la disminución de las principales enfermedades bucales: la caries y las periodontopatías (2)(11).

Con el conocimiento de la biopelícula se emplean nuevas estrategias que consisten en buscar la posibilidad de bloquear el sistema de péptidos intercelulares que estas especies usan para comunicarse y regular su expresión genética. De esta manera, será posible manipular la composición de biofilm de la cavidad bucal y modular su

virulencia. Entre estas nuevas estrategias preventivas se encuentran: Terapias de reemplazo, péptidos anticariogénicos y péptidos antibacterianos (1).

La falta de eficacia de los agentes antimicrobianos que influyen sobre el biofilm, en conjunto con efectos no deseados; dirige la atención en la búsqueda de medicamentos más efectivos. De tal manera que, con la finalidad de combatir algunas infecciones orales ocasionadas principalmente por bacterias del biofilm, han sido utilizadas diversas plantas medicinales, en diferentes formulaciones farmacéuticas. Así tenemos los enjuagues bucales o colutorios, soluciones tópicas, pastas dentales, entre otros, han reportado beneficios a la población tanto en el aspecto terapéutico como económico (12).

#### EJEMPLOS DE PLANTAS UTILIZADAS *IN VITRO*

J. Mariani María, realizó un estudio *in vitro* para evaluar la acción bacteriostática del extracto de cacao en diferentes concentraciones contra cepas de *S. mutans*, midiendo el halo de inhibición, encontrando que el mayor efecto inhibitorio se logró en concentraciones de 10% y 12.5% (13).

Otro estudio descrito por Alvarado compara la actividad antimicrobiana *in vitro* de los extractos hidroalcohólicos de tres plantas medicinales. *Plantago major L.* (Llantén) *Erythroxylum novogranatense*, *Plowmanvar truxillense* (coca Trujillo) y *Camellia sinensis* (té verde) en concentraciones de 25 µg/mL y 50 µg/mL mediante el método de difusión en agar con discos, sobre cinco cepas patrones de bacterias orales: *Streptococci mutans*, *Prevotella melaninogenicus* y *Fusobacterium nucleatum*. La mayor actividad presentó el extracto de *Camellia sinensis* a 50 µg/mL, la menor actividad presentó *Plantago major* a 25 µg/mL (14).

Algo similar, pero en estudios *in vivo* fue referido por Moroni Nakata Hilda. Evalúa el efecto antimicrobiano de la infusión de *Camelia sinensis* (té verde) en forma de colutorio al 10% sobre bacterias orales provenientes de muestras salivales y sembradas en medios de cultivo, posteriormente se realizó el conteo de unidades formadoras de colonias por mL. El análisis estadístico de los resultados, mediante la

prueba de “t” y Wilcoxon, indicó que existen diferencias significativas entre los recuentos realizados. Aceptándose el efecto benéfico del colutorio en la reducción del recuento total de microorganismos (15).

De igual manera Villalobos *et al*, identificaron y contrastaron los índices de placa (IP) e inflamación gingival (IG) en 40 individuos con diagnóstico de gingivitis. Formaron dos grupos (experimental y control) y la evaluación de tratamientos se realizó antes y después de 15 y 30 días de uso continuo de un enjuague bucal elaborado con Aloe vera (sábila), mediante el empleo de 50% de gel y 35mL de glicerina para un litro de enjuague. La forma de empleo indicaba el uso continuo por 30 segundos, durante 30 días, después de cepillarse en la mañana y noche. Los resultados arrojaron una significativa disminución de los valores de los índices (IP, IG) en el grupo experimental a los 15 y 30 días de uso del enjuague elaborado con Aloe vera con relación al grupo tratado con placebo. Concluyeron que el gel de aloe utilizado bajo la forma de enjuague bucal a 50% disminuye la cantidad de placa e inflamación gingival (16).

Posteriormente en la India, un estudio con 245 especies de plantas indicó que 35 de ellas fueron especies locales eficaces en el tratamiento de las enfermedades orales (15). En Burkina Faso, África Occidental, se emplea la decocción de hojas de *Carica papaya L.* e *Ipomoea batatas* en el tratamiento de las odontalgias (17).

Borda *et al*, refieren en el estudio con el extracto alcohólico de frutos, una actividad contra *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. sobrinus* y *Lactobacillus casei*, demostrando que el mecanismo de adhesión de material interfiere con la superficie del diente (18).

Diversos estudios con extractos metanólicos y aceites esenciales de *Lippiacham* han descrito actividad *in vivo* contra *S. mitis*, *S. mutan*), *S. sanguinis* y *S. sobrinus*, *L. casei* (19). Giro *et al*, ya habían demostrado la eficacia del aceite esencial extraído de esta planta en la prueba *in vivo* realizada en organismos con gingivitis (20).

De igual manera Adriana M. *et al*, evaluaron la actividad antimicrobiana de extractos de especies de guayaba contra *S. mutans* ATCC 31089, los resultados

obtenidos indican alta actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos crudos y las fracciones de acetato de etilo (21).

Rodríguez P. realizó una investigación donde fueron valorados los alcances terapéuticos de tres enjuagues a base de aceites esenciales (la menta, el eucalipto y la hierbabuena) disueltos en agua destilada, en comparación con tres enjuagues comerciales reconocidos: Clorexil®, Colgate Plax® y Listerine®. En ese estudio se pudo comprobar la eficacia del enjuague natural de eucalipto como mejora para el control de la biopelícula dental y el mantenimiento del pH salival (22).

Qian Xie (2012); en un estudio *in vitro*, realiza una combinación del extracto natural de berberina con clorhexidina al 2% como sustancia de irrigación contra microorganismos endodónticos patógenos y encuentra que presenta una actividad antimicrobiana comparable con su grupo control de hipoclorito al 5.25% (2).

Mario Leonardo crea un detergente a base de aceite de ricino, efectivo contra bacterias grampositivas (23). Ferreira *et al.*, en 1999 comparan la actividad antimicrobiana del NaClO al 0.5% y el extracto del aceite de ricino como sustancia de irrigación en dientes con necrosis pulpar y periodontitis apical y encontró que el aceite de ricino era más efectivo (23).

Abalankan *et al*, en 2012 prueban la actividad antimicrobiana del extracto acuoso y etanólico a una concentración del 75% frente a bacterias patógenas gram (+) y gram (-), y encuentran susceptibilidad de estos microorganismos frente a los extractos (24).

Cuando se investiga un agente antimicrobiano para tratar una infección, uno de los objetivos más importantes que se busca es la selectividad, que no afecte al hospedero. La utilización de antisépticos y desinfectantes para el control de diferentes agentes infecciosos y contaminantes todavía presenta inconvenientes serios y numerosos trabajos de investigación así lo acreditan (1).

Hay una gran batería de sustancias químicas, antisépticas y desinfectantes con distintos grados de eficacia cuyas ventajas y desventajas se han analizado a lo largo del

tiempo. Es importante recordar los factores que modifican la acción de estos compuestos, así como también su nivel microbiológico (1).

Como se mencionó anteriormente el uso de productos derivados de las plantas pueden representar una estrategia prometedora en la estomatología, dando lugar a nuevas alternativas para tratar diversas patologías relacionadas con la salud bucal.

#### CARACTERÍSTICAS DE *Azadirachta indica* LINN

Neem también es conocido como Nimtree, Indian Lilac, nimmi, limbo, limba (16) es un árbol en la familia de caoba Meliaceae. Es una de las dos especies del género *Azadirachta*, y es nativa de la India y del subcontinente indio, incluidos Nepal, Pakistán, Bangladesh y Sri Lanka. Por lo general, se cultiva en regiones tropicales y semi-tropicales (25).

Se utiliza en la medicina tradicional como fuente de muchos agentes terapéuticos. Sus ramitas proporcionan un palo de mascar y son ampliamente utilizados en el subcontinente indio, estudios anteriores sobre Neem han demostrado que contiene sustancias activas con múltiples propiedades medicinales (26).

Neem elabora una amplia gama de compuestos biológicamente activos que son químicamente diversos y estructuralmente complejos. Se han aislado más de 140 compuestos de diferentes partes de neem (24).

Todas las partes del árbol de neem tales como hojas, flores, semillas, frutos, raíces y corteza se han usado tradicionalmente para el tratamiento de la inflamación, infecciones, fiebre, las enfermedades de la piel y los trastornos dentales. Las utilidades médicas se han descrito especialmente para las hojas (17).

Se ha demostrado que la hoja de neem y sus constituyentes exhiben propiedades inmunomoduladoras, antiinflamatorias, antihiperlipidémicas, antiulcerosas, antimaláricas, antifúngicas, antibacterianas, antivirales, antioxidantes, antimutagénicas y anticancerígenas (27).

## HIPÓTESIS

Elaborar una sustancia irrigadora a base de *Azadirachta indica* ¿Tendrá actividad antimicrobiana contra *E. faecalis*; microorganismo frecuentemente aislado en dientes con fracasos endodónticos fallidos?

## JUSTIFICACIÓN

El problema relacionado con el control y el tratamiento de enfermedades infecciosas bucales sigue sin resolverse, la utilización de antisépticos y desinfectantes para el control de diferentes agentes infecciosos y contaminantes todavía presenta inconvenientes; se ha descrito además la resistencia adquirida por las bacterias ante los fármacos.

Por lo tanto en años recientes se ha dirigido la atención hacia las plantas quienes producen diversos metabolitos secundarios, algunos de ellos con actividad antimicrobiana, considerándose una fuente importante para el hallazgo de nuevos agentes terapéuticos. Por esta razón la utilización de productos naturales, que no provoquen cambios en la ecología natural y no permitan el desarrollo o persistencia de microorganismos oportunistas, podría ser una opción en la terapéutica de estas patologías.

El ser humano comparte el ambiente con infinidad de microorganismos, que forman parte de la biota natural de las cavidades y las superficies corporales del hombre, pero en determinadas circunstancias son capaces de comportarse de manera oportunista y ejercer acciones perjudiciales.

Con relación a lo anterior, en la región de la península de Yucatán se encuentra *Azadirachta indica* una planta endémica con actividad antimicrobiana demostrada contra *S. aureus* y *Helicobacter pylori* entre otras, actualmente no hay información disponible que refiera esta actividad contra bacterias causantes de fracaso endodóntico, por lo que sería interesante encontrar su acción bactericida sobre esta microbiota bucal patógena logrando una mayor protección a los tejidos perirradiculares.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Evaluar *in vitro* la actividad antimicrobiana del irrigante a base del extracto acuoso de hojas de *Azadirachta indica* contra *E. faecalis*

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener el extracto acuoso de hojas de *Azadirachta indica*.
2. Determinar la actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto acuoso de hojas de *Azadirachta indica* contra *Entorococcus faecalis*.

## MATERIAL Y MÉTODOS

DISEÑO DE ESTUDIO: Experimental

### VARIABLES Y ANALISIS ESTADÍSTICOS

<b>Nombre de variable</b>	<b>Tipo de variable</b>	<b>Escala de medición</b>	<b>Objetivo a Cumplir</b>	<b>Análisis estadístico</b>
Actividad antimicrobiana	Independiente	<u>Nominal</u>	Objetivo 1	Experimental
Capacidad del colutorio en eliminar o inhibir el crecimiento bacteriano que se desarrolla en un medio dado		- Presencia - Ausencia de crecimiento bacteriano		

### POBLACIÓN DE ESTUDIO

#### 1. UNIVERSO

Microorganismos pertenecientes al género y especie *E. faecalis*

## METODOLOGÍA

### OBTENCIÓN DE LA CEPA DE *Enterococcus faecalis*

#### Aislamiento:

El aislamiento de la cepa bacteriana fue realizado a partir de materia fecal, la cual, fue inoculada directamente en los medios Agar sal manitol y TSB adicionado con 6.5% de cloruro de sodio, utilizando el cloruro de sodio como inhibidor. Los medios de cultivo se incubaron bajo condiciones de crecimiento a 37°C por 24 horas. A las colonias sugestivas de *E. faecalis* se le realizaron las pruebas de tinción de Gram y prueba de catalasa como pruebas presuntivas de identificación de género.

#### Identificación:

Para la caracterización fenotípica de las cepas aisladas en los medios de cultivos utilizados se emplearon las siguientes pruebas bioquímicas:

Tabla 2. Pruebas bioquímicas de identificación utilizadas para la caracterización fenotípica de *E. faecalis*.

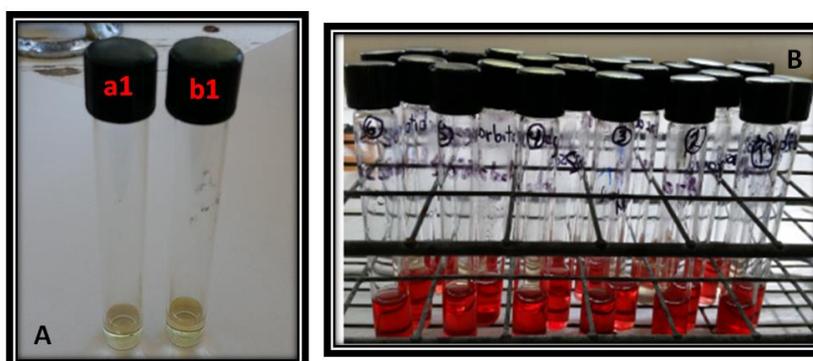
<b>PRUEBA BIOQUÍMICA</b>	<b>INDICADOR</b>
Manitol, Sacarosa, Sorbitol	Cambio de coloración del medio de cultivo
Siembra en caldo de cultivo adicionado con telurito al 0.4%	Cambio de coloración del medio de cultivo
Siembra en caldo de cultivo adicionado con Cloruro de sodio al 6.5%	Presencia de turbidez

Formación de ácidos a partir de manitol, sacarosa y sorbitol, tolerancia al telurito de potasio al .04% y crecimiento en presencia de cloruro de sodio al 6.5%.

Tabla 3. Pruebas bioquímicas de identificación utilizadas para la caracterización fenotípica de *E. faecalis*. (Manual of clinical microbiology)

	1	2	3	4	5	6
Manitol	+	+	+	+	+	+
Sacarosa	+	-	+	+	+	+
Sorbitol	+	-	-/+	-/+	-	-
Telurito	+	-	-	-	-	-
Cloruro de sodio	+	-/+	-/+	+	+	+

1. *E. faecalis*, 2. *Lactococcus spp.* 3. *E. faecium*, 4. *E. casseliflavus*, 5. *E. mundtii*, 6. *E. gallinarium*



A: Medios de cultivo adicionados con telurito al 0.4% (a1) y cloruro de sodio al 6.5% (a2), B: Medios de cultivo adicionados con azúcares (manitol, sacarosa, sorbitol)

Figura 1. Medios de cultivo para pruebas bioquímicas de identificación antes de ser inoculados y sometidos a condiciones de crecimiento bacteriano.

## RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA VEGETAL

### Preparación del extracto acuoso

Se recolectaron hojas de *Azadirachta indica*, autenticadas en el herbario de la Facultad de Biología de la Universidad Autónoma de Yucatán.

Las hojas se lavaron separándolas también de componentes que no forman parte de ella como, tallos, raíces y otros, que pudieran alterar su composición, se dejaron secar a la sombra a temperatura ambiente y posteriormente fueron molidas.

Para la obtención del extracto acuoso se colocaron en cada uno de 2 matraces de 50 mL, 5gr de hojas secas y molidas de *Azadirachta indica*, se añadió a uno de los matraces 50mL y al otro 25 mL de agua destilada, para obtener extractos a concentraciones del 10% y 20% respectivamente. Las mezclas se dejaron reposar durante 24 hrs y posterior a esto se realizó un primer filtrado con papel filtro convencional y los solutos obtenidos se filtraron con membranas millipore de 0.22  $\mu\text{m}$  para su esterilización, todo lo anterior fue realizado bajo condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar. Finalmente se conservó en refrigeración hasta su uso.



Figura 2. Extracto acuoso de *Azadirachta indica* Linn al 10% y 20%  
Controles positivos utilizados

Como control positivo fue utilizado el hipoclorito de sodio de la marca Cloralex® con una concentración referida entre el 4 y 6%. Tomando como referencia una concentración al 5% para la preparación de las diferentes concentraciones utilizadas (Figura 3).

Tabla 4. Soluciones y sus concentraciones para preparación de hipoclorito de sodio a diferentes porcentajes.

<b>DILUCIONES DE HIPOCLORITO DE SODIO</b>	
<b>CONCENTRACIÓN</b>	
0.5%	900 $\mu$ L agua destilada 100 $\mu$ L hipoclorito al 5%
1%	800 $\mu$ L agua destilada 200 $\mu$ L hipoclorito al 5%
2.5%	500 $\mu$ L agua destilada 500 $\mu$ L hipoclorito al 5%
4-6%	Concentración pura de acuerdo a la marca comercial manejada (Cloralex ®)

Además del uso de un antibiótico; ampicilina (2 $\mu$ g/mL)

Como control negativo se utilizó el medio de cultivo Müller Hinton sin adición de ninguna de las soluciones en estudio.



Figura 3. Materiales y soluciones utilizadas para la preparación del hipoclorito de sodio a diferentes concentraciones

## PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD

### Preparación del inóculo

De la cepa identificada como *E. faecalis* se tomó una asada, se sembró en 5mL de Müeller Hinton y se incubó a 37°C durante 2-3 horas (Figura 3).

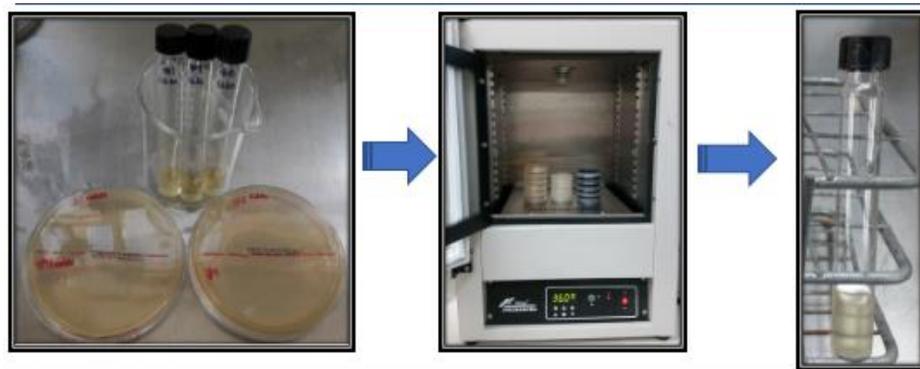


Figura 4. Resiembra de microorganismo a caldo Müeller Hinton.

Pasando el tiempo de incubación se ajustó la densidad a una turbidez equivalente a la del tubo 0.5 del Nefelómetro de McFarland (equivalente a una concentración de aproximadamente  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL), utilizando solución salina estéril; después se procedió a hacer diluciones 1:10 de la suspensión bacteriana quedando lista para usarse como inóculo (Figura 4).



Figura 5. Ajuste del inóculo bacteriano

#### Método de Kirby-Bauer

Se inoculó la cepa de *E. faecalis* en tubos con 2mL de caldo Müller Hinton y se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 2-3 horas. Se ajustó la turbidez tomando como referencia el tubo 0.5 de la escala de McFarland ( $1.5 \times 10^8$  UFC/mL). Figura 5

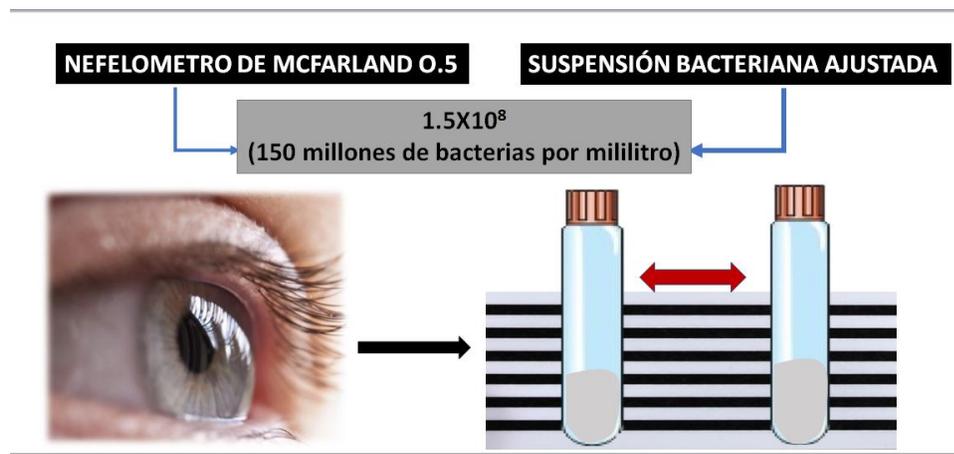


Figura 6. Inóculo bacteriano ajustado al patrón McFarland.

Después se procedió a inocular las cajas de Müller-Hinton de la siguiente manera: se humedeció un hisopo con la suspensión bacteriana, quitando el exceso de caldo

presionando y girando sobre la pared interna del tubo por arriba del nivel del caldo, y se sembró la placa masivamente en tres direcciones para obtener un inóculo uniforme.

Los extractos acuosos se colocaron de tal manera que se pueda prevenir una sobreposición de las zonas de inhibición, separados del borde de la caja. Se dejó reposar la caja 15 minutos y se incubó a 37°C durante 18.24 horas, después de la cual se midieron los halos de inhibición. La interpretación de los diámetros de las zonas de inhibición se realizó según los criterios del NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCL)

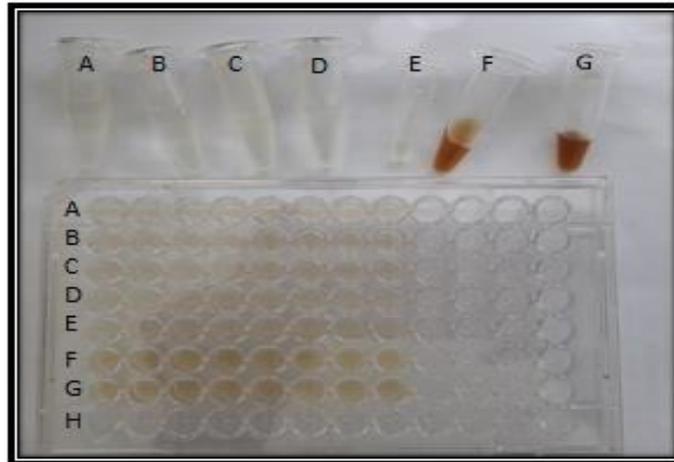
#### Microdilución en caldo del inóculo bacteriano

Se utilizaron microplacas de 96 pozos de fondo en “U”. Se hizo un ajuste bacteriano al 0.5 equivalente al Nefelómetro de McFarland a partir de la cual se realizó diluciones seriadas 1:10 hasta la dilución  $1.5 \times 10^{-8}$  UFC/mL del ajuste bacteriano, depositando 90µL del caldo Müeller Hinton en cada una de las filas (A-H) y columnas (1-8), agregándoles 10µL del inóculo bacteriano, posteriormente se agregaron 10µL de las soluciones a probar según el orden correspondiente en la placa (Figura 6 y 7).

La placa se incubó a 37°C por 24horas. El crecimiento positivo se observó por la presencia de un botón bacteriano. Las pruebas se realizaron una única vez por duplicado por tratarse de una metodología bien estandarizada y descrita en la literatura (Figura 8).



Figura 7. Depósito de medio de cultivo Müeller Hinton, suspensión bacteriana y sustancias antimicrobianas a microplaca.



Fila A: Control positivo: Hipoclorito de sodio al 4-6% (Cloralex®), Fila B: Hipoclorito de sodio al 2.5%, Fila C: Hipoclorito de sodio al 1%, Fila D: Hipoclorito de sodio al 0.5%, Fila E: Ampicilina Ampicilina (2µg/mL), Fila F: Extracto acuoso de *A. indica* al 10%, Fila G: Extracto acuoso de *A. indica* al 20%, Fila H: Control negativo (medio de cultivo inoculado sin la adición del extracto acuoso o alguna de las otras sustancias antimicrobianas)

Figura 8. Microplaca adicionada con Mueller Hinton, suspensión bacteriana y sustancias antimicrobianas

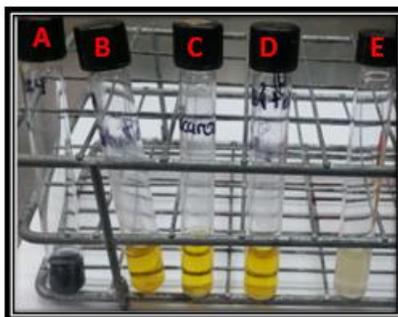
## RESULTADOS

Los cultivos de la cepa se realizaron, su crecimiento quedó evidenciado mediante las pruebas bioquímicas de identificación, en cuanto a la prueba de catalasa se observa síntesis de catalasa, hidrolización del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso que fue liberado en forma de burbujas.

Además, como lo indica la prueba se observa cambio de coloración en los medios adicionados con azúcares; (de una coloración roja a amarillo) tras ser inoculados con el microorganismo en estudio y haberlo sometido a condiciones de crecimiento.

En cuanto al medio adicionado con telurito, se observa de igual manera un cambio en la coloración del medio que va de transparente a negro (Figura 9).

Referente al medio adicionado con cloruro de sodio se observa un patrón de turbidez tras ser inoculado con el microorganismo en estudio y sometido a condiciones de crecimiento (Figura 9).



A: Medio adicionado con telurito al 0.4%, B: medio adicionado con manitol, C: medio adicionado con sacarosa, D: medio adicionado con sorbitol, E: medio adicionado con cloruro de sodio al 6.5%

Figura 9. Cambio de coloración y patrón de turbidez observado en medios de cultivo tras ser inoculado y sometido a condiciones de crecimiento.

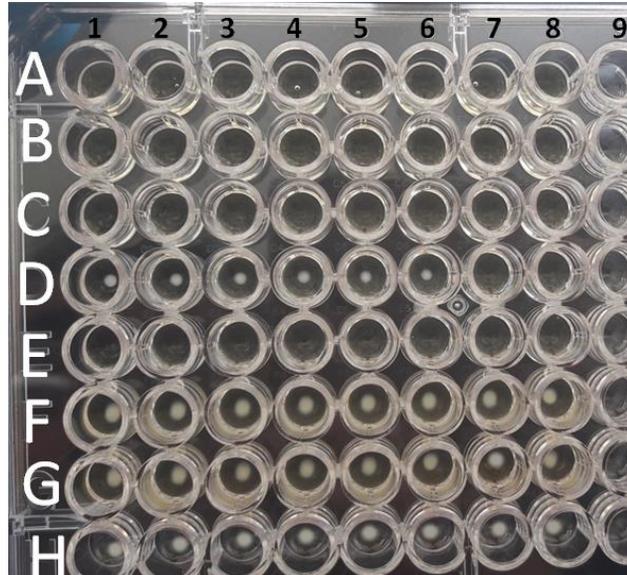
Se puede observar tras la prueba de susceptibilidad que el extracto en ambas concentraciones no resulta ser efectivo contra el microorganismo en estudio a sus

diferentes diluciones, pues se observa en los pozos pertenecientes a los extractos la formación de un botón bacteriano (Figura 8).

Así mismo se logra observar resistencia de *E. faecalis* en sus primeras diluciones frente al hipoclorito de sodio a una concentración de 0.5%, presentando susceptibilidad a este mismo antimicrobiano en las siguientes diluciones.

Como se esperaba *E. faecalis* no solo mostró susceptibilidad al hipoclorito de sodio al 5.25% seleccionado como control positivo, sino que también esta susceptibilidad fue evidente frente a las otras concentraciones del mismo antimicrobiano pero en las diferentes concentraciones utilizadas en este estudio (2.5%, 1%).

Como segundo control positivo fue utilizado un antimicrobiano, en este caso .02  $\mu$ L de ampicilina fue seleccionado para el estudio, nuevamente *E. faecalis* muestra susceptibilidad ante este fármaco, este resultado coincide con el estudio realizado por Abalankan en 2012, donde microorganismos patógenos muestran susceptibilidad ante este antimicrobiano a esta concentración.



Fila A: Control (+) Hipoclorito de sodio al 4-6% (Columna 1: Inóculo bacteriano de *E. faecalis* dilución 1:1, Columna 2: Inóculo bacteriano de *E. faecalis* dilución 1:2, y así en adelante), Fila B: Hipoclorito de sodio al 2.5% (Columna 1: Inóculo bacteriano de *E. faecalis* dilución 1:1, Columna 2: Inóculo bacteriano de *E. faecalis* dilución 1:2, y así en adelante), Fila C: Hipoclorito de sodio al 1% (Columna 1: Inóculo bacteriano de *E.*

*faecalis* dilución 1:1, Columna 2: Inóculo bacteriano de *E. faecalis* dilución 1:2, y así en adelante), Fila D: Hipoclorito de sodio al 0.5% (Columna 1: Inóculo bacteriano de *E. faecalis* dilución 1:1, Columna 2: Inóculo bacteriano de *E. faecalis* dilución 1:2, y así en adelante), Fila E: Control (+) .02μL de Ampicilina (Columna 1: Inóculo bacteriano de *E. faecalis* dilución 1:1, Columna 2: Inóculo bacteriano de *E. faecalis* dilución 1:2, y así en adelante), Fila F: Extracto acuoso de *A. indica* al 10% (Columna 1: Inóculo bacteriano de *E. faecalis* dilución 1:1, Columna 2: Inóculo bacteriano de *E. faecalis* dilución 1:2, y así en adelante), Fila G: Extracto acuoso de *A. indica* al 20% (Columna 1: Inóculo bacteriano de *E. faecalis* dilución 1:1, Columna 2: Inóculo bacteriano de *E. faecalis* dilución 1:2, y así en adelante), Fila H: Control (-) Medio de cultivo inoculado sin la adición del extracto acuoso o alguna de las otras sustancias antimicrobianas.

Figura 10. Placa de microtitulación posterior a su incubación. Se observa formación de botón bacteriano tras la aplicación de prueba de susceptibilidad bacteriana.

Tabla 5. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos acuosos de *A. indica* al 10% y 20% frente a inóculo bacteriano de *E. faecalis* a diferentes diluciones.

SOLUCIONES ANTIMICROBIANAS	ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA							
	Diluciones de inóculo bacteriano de <i>E. faecalis</i>							
	(1:1)	(1:2)	(1:3)	(1:4)	(1:5)	(1:6)	(1:7)	(1:8)
Control positivo, Hipoclorito de sodio al 5.25%	+	+	+	+	+	+	+	+
Hipoclorito de sodio al 2.5%	+	+	+	+	+	+	+	+
Hipoclorito de sodio al 1%	+	+	+	+	+	+	+	+
Hipoclorito de sodio al 0.5%	-	-	-	-	-	-	-	+
Control Positivo 2μg/mL de Ampicilina	+	+	+	+	+	+	+	+
Extracto acuoso de Neem al 10%	-	-	-	-	-	-	-	-
Extracto acuoso de Neem al 20%	-	-	-	-	-	-	-	-
Control Negativo	-	-	-	-	-	-	-	-

Actividad Antimicrobiana, + Positiva, -Negativa

## DISCUSIÓN

Abalanka M. *et al*, en 2012 probaron la actividad antibacteriana de *Azadirachta indica* contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella ozanae*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, y encuentran susceptibilidad frente al extracto vegetal; en el presente estudio *E. faecalis*, mostró resistencia al extracto, esta resistencia la podemos atribuir a las concentraciones utilizados en nuestro estudio, correspondientes al 10% y 20% que resultan ser inferiores a las probadas en el estudio mencionado el cuál, además de utilizar al extracto acuoso a una concentración del 75%, prueba el extracto etanólico a la misma concentración, además es importante mencionar que el etanol resulta ser mejor disolvente que el agua destilada y permite un mejor y mayor arrastre de productos metabólicos presentes en la planta. Otro factor que pudo haber influenciado en nuestros resultados es el tipo de bacteria con la que se trabajó, *E. faecalis* es un microorganismo grampositivo, que por sus características estructurales y fisiológicas presentan un mecanismo de resistencia superior a las bacterias gram negativas, Abalankan somete la actividad de sus extractos frente a bacterias gram negativas. Como control positivo utilizó la ampicilina al igual que nuestro estudio y en ambos casos se observó susceptibilidad a dicho antimicrobiano.

Talvar *et al*, 1997, Biswas, *et al*, 2002, Subapriya, *et al*, 2005 mencionan que la hoja de neem y sus constituyentes (raíces, tallos, etc) exhiben propiedades antiinflamatorias, antihiperlipémicas, antiulcerosas, antimaláricas, antifúngicas, antibacterianas, antivirales, antioxidantes, antimutagénicas y anticancerígenas; sin embargo, en nuestro estudio, la actividad antibacteriana no mostró ser importante, probablemente por las razones anteriormente mencionadas, otro motivo pudiera ser que el extracto fue a base de las hojas, sin involucrar otras partes de la planta de las cuales pudieran obtenerse un mayor número de compuestos metabólicos

En un estudio realizado por Mario Roberto, *et al*, prueban al hipoclorito de sodio al 0.5% frente a ciertos microorganismos, el cual muestra actividad contra *S. aureus*, pero no frente a *E. faecalis*, estos resultados varían ligeramente respecto a los encontrados en nuestro estudio, dónde el microorganismo fue resistente al hipoclorito de

sodio al 0.5% en sus primeras diluciones pero muestra susceptibilidad en sus diluciones posteriores, podríamos atribuir la actividad antimicrobiana del hipoclorito al 05% frente al número de bacterias presentes, mismo que disminuye respecto al número de dilución.

## CONCLUSIÓN

En conclusión el extracto acuoso de *A. indica* en concentraciones del 10% y 20% parece no presentó actividad antimicrobiana frente a *E. faecalis*

Si bien es cierto que se ha logrado aislar más de 140 compuestos diferentes biológicamente activos, los cuales le brindan múltiples propiedades medicinales a este espécimen vegetal, se sugiere realizar más estudios a diferentes concentraciones y con diferentes tipos de disolventes y extractos que permita la obtención de un mayor número de metabolitos secundarios.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Negroni M. Microbiología Estomatológica: fundamentos y guía práctica. 2009.
2. Xie Q, Johnson BR, Wenckus CS, Fayad MI, Wu CD. Efficacy of berberine, an antimicrobial plant alkaloid, as an endodontic irrigant against a mixed-culture biofilm in an in vitro tooth model. J Endod. 2012;38(8):1114–7.
3. Tong Z, Ling J, Lin Z, Li X, Mu Y. The effect of MTADN on 10 enterococcus faecalis isolates and biofilm: An in vitro study. J Endod. 2013;39(5):674–8.
4. Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated root canals. J Endod. 2002;28(10):689–93.
5. Rôças IN, Provenzano JC, Neves MAS, Siqueira JF. Disinfecting Effects of Rotary Instrumentation with Either 2.5% Sodium Hypochlorite or 2% Chlorhexidine as the Main Irrigant: A Randomized Clinical Study. J Endod. 2016;42(6):943–7.
6. Abbot PV. Diagnosis and management planning for root-filled teeth with persisting or new apical pathosis. Endod Top. 2008;19(1):1–21.
7. Sen BH, Safavi KE, Spångberg LS. Antifungal effects of sodium hypochlorite and chlorhexidine in root canals. J Endod. 1999;25(4):235–8.
8. Delgado RJR, Gasparoto TH, Sipert CR, Pinheiro CR, Moraes IG, Garcia RB, et al. Antimicrobial effects of calcium hydroxide and chlorhexidine on Enterococcus faecalis. J Endod. 2010;36(8):1389–93.
9. Zehnder M. Root Canal Irrigants. J Endod. 2006;32(5):389–98.
10. Dunavant TR, Regan JD, Glickman GN, Solomon ES, Honeyman AL. Comparative Evaluation of Endodontic Irrigants against Enterococcus faecalis Biofilms. J Endod. 2006;32(6):527–31.

11. Du T, Wang Z, Shen Y, Ma J, Cao Y, Haapasalo M. Effect of long-term exposure to endodontic disinfecting solutions on young and old *Enterococcus faecalis* biofilms in dentin canals. *J Endod.* 2014;40(4):509–14.
12. Teresa Herrera Mendoza Bac Esp M, Revisión A DE. El papel del biofilm en el proceso infeccioso y la resistencia. *Nova.* 2004;2(2):71–80.
13. Mariani M, Jaimes G, Fernandez Da Silva R. Efecto bacteriostático del extracto de semillas de cacao (*Theobroma cacao* L.) sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans* in vitro. *Odous Cient.* 2010;11(1):15–22.
14. Plantago L. Plantas medicinales : Efecto antibacteriano in vitro de sobre bacterias de importancia estomatológica. 2010;13(2):21–5.
15. Efecto antimicrobiano in vivo de la infusión de *Camellia sinensis* sobre bacterias orales. 2007;10(2):12–4.
16. Kanniappan N, Roy A, Ganapathy D, Sheeba PS. Plant remedies for peptic ulcer – A review. 2018;12(2):2017–9.
17. Adil S, Qureshi S, Pattoo RA. A review on positive effects of fenugreek as feed additive in poultry production. *Int J Poult Sci.* 2015;14(12):664–9.
18. Borba AM, Macedo M. Plantas medicinais usadas para a saúde bucal pela comunidade do bairro Santa Cruz, Chapada dos Guimarães, MT, Brasil. *Acta Bot Brasilica.* 2006;20(4):771–82.
19. Pereira J V., Pereira MSV, Sampaio FC, Sampaio MCC, Alves PM, Araújo CRF De, et al. Efeito antibacteriano e antiaderente in vitro do extrato da *Punica granatum* Linn. sobre microrganismos do biofilme dental. *Rev Bras Farmacogn.* 2006;16(1):88–93.
20. Girão VCC, Nunes-Pinheiro DCS, Morais SM, Sequeira JL, Gioso MA. A clinical trial of the effect of a mouth-rinse prepared with *Lippia sidoides* Cham essential oil in dogs with mild gingival disease. *Prev Vet Med.* 2003;59(1–2):95–102.

21. Neira, A. y Ramírez M. Actividad antibacteriana de extractos dos especies de guayaba contra *Streptococcus Mutans* Y *Escherichia Coli*. *Acta Biológica Colomb.* 2005;27(1):27–30.
22. Murray PE, Farber RM, Namerow KN, Kuttler S, Garcia-Godoy F. Evaluation of *Morinda citrifolia* as an Endodontic Irrigant. *J Endod.* 2008;34(1):66–70.
23. Leonardo MR, Bezerra LA, Silva D, Filho MT, Bonifacio KC, Ito Y. In Vitro Evaluation of the Antimicrobial Activity of a Castor Oil-Based Irrigant. *J Endod .* 2001;27(12):717–9.
24. M. A, O. a. O, a. R. K. Antibacterial Activities of *Azadirachta Indica* against Some Bacterial Pathogens. *Adv Life Sci.* 2012;2(2):5–8.
25. Sarup P, Jana A, Bhatia M. An Exhaustive Survey on Poly Herbal Treatments available for Curbing Diabetes Mellitus. 2016;5(1).
26. Koon S, Budida S. Antibacterial Potential of the Extracts of the Leaves of *Azadirachta indica* Linn. *In Vitro.* 2011;3(1):65–9.
27. Maragathavalli, S., Brindha, S., Kaviyarasi, N. S., Annadurai, B. B., Gangwar SK. Antimicrobial Activity in Leaf Extract of Neem (*Azadirachta Indica*). *Int J Sci Nat.* 2012;3(1):110–3.